

DEP 99 / 04310
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 985 / 4310

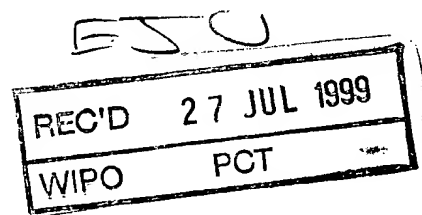
09/720006

22. Juni 1999

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung



Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verbesserung von Bindeassays durch Multiepitopenalyse und
Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung"

am 26. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht und erklärt, daß sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik Deutschland vom 22. Juni 1998, Aktenzeichen 198 27 714.8, in Anspruch nimmt.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in: Roche Diagnostics GmbH.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/543 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. April 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust



Aktenzeichen: 198 38 802.0

PATENTANWÄLTE
European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEIGMANN**
DIPL.-ING. **F. A. WEIGMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISK**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0

TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

eMail weickmann@compuserve.com

Unser Zeichen:
17316P DE-1/WWvo

Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof

Verbesserung von Bindeassays durch Multiepitopenalyse
und Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung

M 22.06.99

- 1 -

Verbesserung von Bindeassays durch Multiepitopenalyse und Kombination von Antigen- und Antikörper-Bestimmung

5

Beschreibung

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, wobei der Nachweis des Analyten mit unterschiedlichen, an den Analyten bindefähigen Reagenzien geführt wird. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Festphase zum Nachweis eines Analyten, wobei die Festphase einen nichtporösen Träger und räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei jede Testfläche unterschiedliche Reagenzien enthält. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers sowie eine Festphase zur Durchführung dieses Verfahrens.

20

Eine Vielzahl von Analyten kann durch immunologische Nachweisverfahren bestimmt werden. Solche immunologische Nachweisverfahren nutzen die spezifische Bindefähigkeit von Analyten mit bestimmten Reagenzien, wie beispielsweise Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Grundsätzlich können immunologische Bestimmungen in einer Reihe von Testformaten durchgeführt werden, wie etwa dem Sandwichtestformat, dem indirekten Testformat, dem Rücktitrationsformat oder dem Brückenformat.

25

30

Ein zuverlässiger Nachweis von Infektionserkrankungen, z.B. einer Infizierung mit Viren wie etwa HIV, HBV oder HCV, ist von besonderem Interesse, um die Erkrankung bei betroffenen Personen möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können. Im Allgemeinen werden immunologische Bestimmungen von Antikörpern gegen HIV, HBV oder HCV im indirekten Testformat oder mittels Brückenformat durchgeführt. Zum Nachweis der Antikörper werden dabei zumeist Gemische verschiedener Proteine bzw.

Peptide verwendet, die Epitope aus der Core- und Envelope-Region des Erregers umfassen. Dieses Gemisch wird auf einem Träger, d.h. einer Festphase, immobilisiert. Da die Einstufung als HIV-positiv für den Einzelnen von großer Bedeutung ist und falsch positive Ergebnisse fatale Folgen haben können, ist es derzeit notwendig, alle bei dieser immunologischen Bestimmung in Routinetests erhaltenen positiven Ergebnisse in einem Bestätigungstest zu überprüfen. Als Bestätigungstest wird üblicherweise ein Westernblot verwendet, bei dem die einzelnen Proteinbestandteile eines Viruslysats auf einen porösen Träger aufgeblottet sind. Im Fall von HCV ist es allerdings sehr schwierig, den Virus zu züchten. Deshalb wird hier als Bestätigungstest kein Westernblot mit Viruslysat sondern ein RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) durchgeführt, bei dem es sich um einen Immunodotblot, der rekombinante Proteine bzw. Peptide als Testreagenzien umfaßt, handelt.

Ein großer Nachteil der derzeit verwendeten Routinetests besteht darin, daß je nach Analyt Gemische von 5 bis 10 oder mehr Antigenen zum Nachweis eingesetzt werden. Zwar werden die Routinetests laufend verbessert, ein vollständiger Verzicht auf Bestätigungstests konnte jedoch noch nicht erreicht werden. Beispielsweise wird im Enzygum® HIV-Test (Boehringer Mannheim) ein Gemisch aus ca. 5 verschiedenen Antigenen verwendet, welche für den Nachweis sowohl biotinyliert als auch Digoxigenin-markiert sind. Obwohl der Test gut funktioniert, bedeutet die Verwendung von Antigengemischen mit einer derart hohen Anzahl verschiedener Antigene, daß die einzelnen auf der Festphase immobilisierten bzw. gebundenen Antigene nicht mehr in einer für den Nachweis optimalen Konzentration vorliegen können. Die Bindekapazität der Festphase ist bei einem solchen Gemisch aus einer Vielzahl von Komponenten nicht mehr ausreichend, um alle Antigene in der optimalen Konzentration zu binden. Weiterhin hat die Verwendung eines Antigen-Gemisches bei der Beschichtung einer Testfläche zur Folge, daß die verschiedenen Antigene um die Bindungsstellen auf der Festphase kompetieren und die unterschiedlichen

M 22.06.99

- 3 -

Größenverhältnisse zu unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten und zu unterschiedlichen sterischen Effekten führen. Bei einer Direktbeschichtung werden z.B. hydrophobe Antigene bevorzugt an die Kunststoffoberfläche gebunden, während gleichzeitig hydrophilere Antigene verdrängt werden. Dies führt dazu, daß zum einen nur schlecht reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden und zum anderen die Konzentration bestimmter Antigen-Epitope so gering wird, daß ein signifikanter Nachweis nicht mehr möglich ist.

Ein weiterer Nachteil der Verwendung von Antigengemischen in Routinetests liegt darin, daß durch das Gemisch unterschiedlicher Antigene die Gefahr einer erhöhten unspezifischen Bindung deutlich gesteigert wird, was wiederum zu einem Anstieg falsch positiver Ergebnisse führt. Dies bewirkt, daß bei den bisher verwendeten Routinetests die Cut-off-Grenze relativ hoch gesetzt werden muß und somit Sensitivität verloren geht. Vor allem im Westernblot nimmt aufgrund von im Viruslysats vorliegenden Fremdproteinen die Zahl der falschpositiven Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindung deutlich zu, so daß mindestens 2 reaktive Banden für ein positives Ergebnis gefordert werden.

Es wurde versucht, die Sensitivität dieser Nachweisverfahren weiter zu verbessern. EP 0 461 462 A1 beschreibt einen Immunoassay zum Nachweis von viralen Antikörpern mit Hilfe eines indirekten Testkonzepts. Bei dem in EP 0 461 462 A1 beschriebenen Immunodotblot werden anstelle eines üblichen Viruslysats aufgereinigte rekombinante Proteine einzeln in diskreten Testflächen auf einen porösen Träger aufgetragen, wobei ein Testformat erhalten wird, das aufgrund der Verwendung aufgereinigter Proteine sensitiver als ein Westernblot ist.

EP 0 627 625 A1 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von viralen Antikörpern in einer Probe mittels Brückenkonzept. Auch bei diesem Verfahren handelt es sich um einen RIBA (Recombinant Immunoblot Assay),

bei dem mehrere Antigene räumlich getrennt auf eine Festphase aus einem porösen Material aufgebracht werden, wobei auf die Notwendigkeit der Verwendung einer Festphase aus porösem Material hingewiesen wird.

5 EP 0 445 423 A2 betrifft ein Verfahren zum Nachweis von HCV-Antikörpern mit Hilfe mehrerer Epitope eines HCV-Antigens. Auch in EP 0 445 423 A2 wird ein Immunodotassay zur Antikörperbestimmung beschrieben, wobei eine höhere Sensitivität durch die Verwendung bestimmter, verbesserter Antigene erzielt wird.

10

Bei diesen im Stand der Technik beschriebenen Verfahren ist jedoch aufgrund der Verwendung eines porösen Trägers das definierte Aufbringen einer vorbestimmten Reagenzmenge schwierig. Insbesondere besteht die Gefahr des Ineinanderlaufens der einzelnen aufgetragenen Testspots. Diese Nachteile werden um so gravierender, je kleiner die aufgetragenen Spots werden, so daß diese Verfahren insbesondere für miniaturisierte Testsysteme nicht geeignet sind. Außerdem ist die Handhabung von Papierstreifen schwer automatisierbar und somit als Routinetest nicht denkbar.

20

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, durch das die im Stand der Technik auftretenden Nachteile zumindest teilweise beseitigt werden können.

25

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

30

(a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,

M 22.06.99

- 5 -

- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen.

Der immobilisierte analytspezifische Rezeptor kann sowohl direkt als auch indirekt über einen oder mehrere Rezeptoren an die Festphase gebunden sein. Die Bindung kann beispielsweise durch adsorptive oder kovalente Wechselwirkungen, bevorzugt jedoch durch spezifische hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin oder Avidin/Biotin oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen erfolgen.

Der freie analytspezifische Rezeptor kann selbst eine signalgebende Gruppe tragen oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig sein. In diesem Fall besteht das Nachweisreagenz aus mehreren Komponenten.

Bei dem Analyten kann es sich um eine homogene oder um eine heterogene Population, z.B. eine heterogene Antikörperpopulation, ein Antigengemisch oder ein Gemisch von gegebenenfalls unterschiedlichen Antigenen und Antikörpern handeln, wobei die Antigene und Antikörper von einem oder mehreren Erregern stammen bzw. induziert werden. Die einzelnen Testflächen binden im Fall von heterogenen Analytpopulationen eine Teilpopulation des zu bestimmenden Analyten. Die jeweils auf einer Testfläche immobilisierten analytspezifischen Rezeptoren sind unterschiedlich, d.h. sie binden erfindungsgemäß vorzugsweise an verschiedene Epitope eines homogenen Analyten wie etwa eines Antigens, an verschiedene Analytsubtypen wie etwa Antigensubtypen oder/und an verschiedene Analyttypen wie etwa unterschiedliche Antigene oder/und Antikörper.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die Sensitivität von Nachweistests, wie etwa Antikörpertests, durch die Verwendung von Paneltests, bei denen die verschiedenen Reagenzien, z.B. verschiedene Antigene, als Einzelspots, d.h. einzeln auf separaten Testflächen, aufgetragen werden, deutlich verbessert werden kann. Durch die erfindungsgemäße Multiepitopenanalyse, d.h. den gleichzeitigen separaten Nachweis mehrerer Teilpopulationen eines Analyten oder Erregers, wie etwa HIV, kann die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Nachweistests erheblich gesteigert werden.

Wenn auf einer oder mehreren, in manchen Fällen auf mindestens zwei, Testflächen ein positives Testergebnis erhalten wird, wird dies als Vorhandensein des Analyten in der Probe gewertet.

Durch die erfindungsgemäße Verwendung eines nichtporösen Trägers, ist es möglich, die Reagenzien in definierten Flächen aufzubringen. Dies ist insbesondere bei miniaturisierten Testformaten von Bedeutung. Entsprechend weisen die Testflächen bevorzugt einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm, mehr bevorzugt von 0,1 bis 0,5 mm und am meisten bevorzugt von 0,1 bis 0,2 mm auf.

Bevorzugt werden Festphasen mit mehreren Testflächen verwendet, die auch als Array-Systeme bezeichnet werden. Solche Array-Systeme sind z.B. bei Ekins und Chu (Clin. Chem. 37 (1995) 1955-1967) und in den US-Patenten 5,432,099, 5,516,635 und 5,126,276 beschrieben.

Die erfindungsgemäß verwendete Festphase umfaßt einen für Nachweisverfahren verwendbaren, nichtporösen Träger. Der nichtporöse Träger kann dabei aus einem beliebigen, nichtporösen Material bestehen. Bevorzugt umfaßt der Träger eine Kunststoff-, Glas-, Metall- oder Metalloxydoberfläche. Besonders bevorzugt weist der Träger eine Polystyroloberfläche auf. Auf diesem Träger sind räumlich diskrete Bereiche (Testflächen) angeordnet. Auf

M 22.06.99

- 7 -

diesen Testflächen sind Reagenzien, wie etwa immobilisierte Festphasen-
rezeptoren aufgebracht. Die Immobilisierung der Reagenzien auf den Test-
flächen erfolgt nach bekannten Methoden, z.B. durch direkte adsorptive Bin-
dung, durch kovalente Kopplung oder durch Kopplung über hochaffine Bin-
5 depaare, z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin.

Besonders vorteilhaft ist, wenn die räumlich getrennten Testflächen separat
mit verschiedenen Reagenzien beladen werden. Durch die Einzelauftragung
der verschiedenen Testflächen können für jedes Reagenz, beispielsweise für
10 jedes einzelne Antigen, die optimale Festphasenkonzentration und die opti-
malen Beschichtungsbedingungen z.B. in Form von speziellen
Pufferrezepturen gewählt werden. Dadurch ist es möglich, jeden einzelnen
analytspezifischen Rezeptor, z.B. jedes einzelne Antigen bis zur maximalen
Bindekapazität der Fläche zu beschichten, während bei den bisher
15 bekannten Tests jeder Rezeptor, z. B. jedes Antigen nur zu einem Teil der
verfügbaren Bindekapazität gebunden werden konnte. Durch die separate
Auftragung der verschiedenen Reagenzien findet außerdem keine Kompe-
tition der einzelnen Reagenzien, beispielsweise der Antigene, um die
Bindungsplätze auf der Festphase statt. Entsprechend ist es bevorzugt,
20 jeweils nur ein Reagenz, das spezifisch mit dem zu bestimmenden Analyten
bindefähig ist, pro Testfläche zu binden, so daß jede Testfläche nur einen
einzigen Typ eines immobilisierten analytspezifischen Rezeptors enthält.
Dieses Reagenz kann gegebenenfalls durch inerte Verdünnermoleküle
verdünnt werden, um eine optimale homogene Bindephase zu bilden. Inerte
25 Verdünnermoleküle sind Moleküle, die an die Festphase binden aber keine
Wechselwirkung mit dem Analyten oder anderen Probebestandteilen
eingehen. Geeignete Verdünnermoleküle sind beispielsweise in WO
92/10757 und in EP 0 664 452 A2 beschrieben.

30 Bei Testflächen, auf denen nur ein einziges, mit dem Analyten bindefähiges
Reagenz, wie etwa ein Antigen, gebunden ist, wurde festgestellt, daß die
unspezifische Bindung deutlich reduziert ist. So ist z.B. bei Auftragung

M 22.06.99

- 8 -

verschiedener Antigene als Einzelspots keine meßbare unspezifische Bindung zu beobachten, während ein Testspot, auf den ein Gemisch aus mehreren Antigenen aufgebracht wurde, eine deutlich meßbare unspezifische Bindung zeigt.

5

Der Nachweis des Analyten erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren auf bekannte Weise durch Verwendung geeigneter Markierungsgruppen, z.B. Fluoreszenzmarkierungsgruppen, chemilumineszierender Gruppen, radioaktiven Markierungen, Enzymmarkierungen, farbigen Markierungen und Solpartikeln. Alternativ kann, bei geeigneten Festphasen, die Wechselwirkung von Bestandteilen des Nachweismediums mit den Testflächen auch durch Bestimmung der Schichtdicke der jeweiligen Flächen z.B. durch Plasmonenresonanzspektroskopie, nachgewiesen werden.

10

Die begrenzten Testflächen können darüber hinaus zur Unterscheidung gegenüber inerten Bereichen der Festphase eine nachweisbare und analytunspezifische Markierungsgruppe enthalten, die neben der analytspezifischen Beschichtungsgruppe nachweisbar ist und mit ihr nicht interferiert. Ein Beispiel für eine solche analytunspezifische Markierungsgruppe ist eine Fluoreszenz-Markierungsgruppe, die bei einer Wellenlänge fluoresziert, die von der Fluoreszenzwellenlänge einer analytspezifischen Markierungsgruppe verschieden ist. Die analytunspezifische Markierungsgruppe wird vorzugsweise, ebenso wie der Festphasenrezeptor, über ein hochaffines Bindepaar, z.B. Streptavidin/Biotin immobilisiert.

20

25

Eine weitere Sensitivitätssteigerung kann durch die Verwendung eines universellen Nachweisreagenz erreicht werden. Zuvor kann für jedes Analytmolekül ein separates Nachweisreagenz, welches an das Analytmolekül bindet und eine Markierung, wie etwa ein Enzym, einen Fluoreszenzmarker oder fluoreszierende Latexpartikel trägt, eingesetzt werden. Durch die Kombination mehrerer markierter Nachweisreagenzien

30

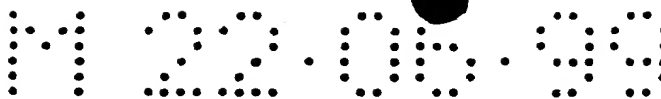
11.22.05.99

- 9 -

wird jedoch oftmals die Konzentration an Markierungen sehr hoch, so daß die unspezifische Bindung naturgemäß stark zunimmt. Dieses Problem kann durch die Verwendung eines universellen Nachweisreagenz gelöst werden. Erfindungsgemäß bevorzugt werden fluoreszenzmarkierte Latexpartikel als universelles Nachweisreagenz verwendet. Dabei wird für die spezifische Bindung des Analytmoleküls ein analytspezifischer erster Rezeptor verwendet, der selbst keine signalgebende Gruppe trägt. An diesen analytspezifischen ersten Rezeptor bindet ein universeller zweiter markierter Rezeptor, d.h. ein Rezeptor, der analytunabhängig an mehrere, vorzugsweise an alle verwendeten ersten Rezeptoren bindet. Die Kopplung des zweiten Rezeptors an die Markierungsgruppe kann adsorptiv, kovalent über funktionelle Gruppen erfolgen oder über hochaffine Bindepaare, z.B. Streptavidin/Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin erfolgen. Bevorzugt wird das bekannte Dig/Anti-Dig-System verwendet.

Ein weiterer Nachteil der Brückentests, die z.B. als 1-Schritt-Reaktion ausgeführt werden, ist, daß der Festphasenrezeptor (z.B. biotinyliertes HIV-gp41) und der freie Nachweisrezeptor (z.B. digoxigenyliertes HIV-gp41) im Verhältnis 1:1 angeboten werden müssen, um ein optimales Signal zu erzielen. Dies ist nachteilig, da aufgrund der beschränkten Bindekapazität der Festphase die Konzentration der einzelnen Festphasenrezeptoren oftmals suboptimal ist und somit auch für den Nachweisrezeptor nicht günstig liegen kann.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können die Festphasenrezeptoren bereits auf der Festphase in optimaler Konzentration gebunden werden. Weiterhin kann auch der Nachweisrezeptor in optimaler Konzentration angeboten werden, da Rezeptorkonjugate mit Digoxigenin oder Biotin im Gegensatz zu Enzym-markierten Rezeptoren nur unwesentlich zu unspezifischer Bindung neigen. Man kann diese Reagenzien im Überschuß einsetzen, so daß Impräzisionen bei der Zugabe des Rezeptors nicht auf die Testpräzision durchschlagen.



Durch spezifische Bindung des zu bestimmenden Analyten an das auf die Testfläche immobilisierte Reagenz, z.B. einen Festphasenrezeptor, kann das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in einer Probe bestimmt werden. Durch kombinierte Auswertung der verschiedenen Testflächen, die
5 jeweils unterschiedliche, spezifisch mit dem Analyten bindefähige Reagenzien enthalten, kann die Sensitivität des Nachweisverfahrens, insbesondere durch eine Verringerung falsch positiver Ergebnisse und die zweifelsfreie Erkennung richtig positiver Ergebnisse, merklich verbessert werden. Von besonderem Interesse ist das erfindungsgemäße Verfahren zur
10 Erfassung bzw. Eliminierung von unspezifischen Bindungen bei qualitativen Tests mit hohen Anforderungen an die Spezifität, wie etwa bei Tests auf Infektionen (z.B. HIV).

Durch die erfindungsgemäße Verwendung von Arrays, d.h. Festphasen, die
15 mindestens zwei, mehr bevorzugt mindestens drei, am meisten bevorzugt mindestens fünf, und bis zu eintausend, mehr bevorzugt bis zu einhundert räumlich getrennte Testflächen umfassen, ist es möglich, mindestens eine dieser Testflächen so auszugestalten, daß sie eine Kontrollfläche darstellt. Folglich umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt die Ver-
20 wendung einer Festphase, die zusätzlich mindestens eine, mehr bevorzugt zwei und am meisten bevorzugt mindestens fünf Kontrollflächen umfaßt. Durch die Integration von Kontrollspots in die Festphase ist es möglich, falsche Resultate aufgrund von Störungen leicht und schnell zu erkennen. Neben den spezifischen Testflächen, ist es weiterhin möglich, einen
25 probenspezifischen Untergrund zu messen und damit einen probenspezifischen Cut-off zu definieren. Die Verwendung eines Testarrays und die Verwendung von Kontrollspots ermöglicht es, die Cut-off-Grenze abzusenken. Der Cut-Off-Wert ist ein Grenzwert, der bei Testverfahren eingesetzt wird, um zwischen positiven und negativen Werten
30 unterscheiden zu können. Ein solcher Cut-Off-Wert ist insbesondere bei Testverfahren, welche Infektionskrankheiten betreffen, von Bedeutung. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich eine Positiv-

11.22.05.99

- 11 -

/Negativ-Unterscheidung mit erheblich geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit zu treffen.

5 Bei Verwendung von mehreren Testflächen, die jeweils zur Bestimmung unterschiedlicher Analytmoleküle vorgesehen sind, hat sich oftmals eine testflächenspezifische Definition des Cut-Off-Werts als geeignet erwiesen, um eine erhöhte Testspezifität (d.h. korrekte Unterscheidung zwischen positiven und negativen Werten) bei gleichbleibender Sensitivität zu erhalten.

10

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für beliebigen Nachweismethoden eingesetzt werden, z.B. für Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-Lectin-Assays und ähnliche Verfahren. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch grundsätzlich zum Nachweis beliebiger Analyten in einer Probe. Besonders bevorzugt erfolgt der Nachweis des Analyten über spezifische Wechselwirkungen mit einem oder mehreren mit dem Analyten bindefähigen Reagenzien, d.h. Rezeptoren, die bevorzugt aus Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Antigenen, Haptenen und Nukleinsäuren ausgewählt werden.

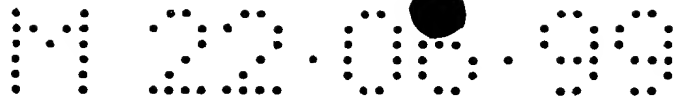
20

Während ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst darin besteht, die Sensitivität des Nachweises eines einzigen Analyten zu verbessern, können bei geeigneter Wahl der Testflächen auch mehrere Analyten gleichzeitig mit hoher Sensitivität bestimmt werden.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch mit dem zu bestimmenden Analyten bindefähig sind.

30



Bevorzugt enthalten die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien, die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen eines Analyten oder/und an verschiedene Analyttypen binden.

- 5 Um eine möglichst große Anzahl von Testflächen auf einer Festphase unterzubringen, werden bevorzugt miniaturisierte Testformate verwendet. Der Abstand zwischen den einzelnen Testflächen wird so gewählt, daß ein Ineinanderlaufen der aufgetragenen Reagenzien nicht möglich ist. Üblicherweise reicht es hierfür aus, wenn die Ränder der Testflächen einen
- 10 Abstand von 0,05 bis 5 mm aufweisen. Zwischen den Testflächen befindet sich bevorzugt eine inerte Oberfläche, die weder mit dem Analyten noch mit sonstigen Probebestandteilen bindefähig ist.

- Die erfindungsgemäße Festphase kann in beliebigen Nachweisverfahren
- 15 eingesetzt werden, z.B. in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-Lectin-Assays und dergleichen. Bevorzugt wird sie in einem Immunoassay zum Nachweis von Antikörpern oder/und Antigenen verwendet.

- 20 Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welches eine erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien umfaßt. Markierte Nachweisreagenzien sind dem Fachmann bekannt und umfassen im allgemeinen eine Markierungsgruppe sowie eine spezifisch bindefähige Gruppe, die den Nachweis des Analyten
- 25 ermöglicht. Geeignete Markierungsgruppen sind z.B. Fluoreszenz-, Chemilumineszenz-, Enzym-, radioaktive oder Partikel-(Sol)-Markierungsgruppen. Die spezifisch bindefähige Gruppe kann z.B. mit dem gebildeten Analytkomplex bindefähig sein oder bei kompetitiven Testformaten mit anderen Bestandteilen des Nachweissystems. Bevorzugt
- 30 umfaßt der Testkit ein universelles Konjugat als Nachweisreagenz, insbesondere fluoreszenzmarkierte Latexpartikel, welches mit den für den Analyten spezifischen Nachweisrezeptoren bindefähig ist.

Ein weiteres Problem herkömmlicher Routinetests besteht darin, daß die gleichzeitige Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Messung nicht durchführbar ist. Aus diesem Grund wird bei sogenannten HIV-Kombinationstests beispielsweise eine Bestimmung des Antigens p24 und von Antikörpern gegen andere HIV-Antigene gleichzeitig durchgeführt. Bei einem solchen Test können dann lediglich Antikörper gegen andere HIV-Antigene, wie beispielsweise gp41 oder gp120 bestimmt werden, während die Bestimmung von Antikörpern gegen p24 nicht möglich ist.

US-PS-5,627,026 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis eines Antikörpers und eines Antigens in einer biologischen Probe. So wird beispielsweise ein Assay zur Bestimmung des FeLV-Antigens und des FIV-Antikörpers beschrieben. Auch gemäß dem Verfahren von US-PS-5,627,026 können bei der Bestimmung eines Antigens im gleichen Test lediglich Antikörper, die gegen andere Antigene gerichtet sind, nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer Probe bereitzustellen. Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren umfassend die Schritte

- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der in einer ersten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und

(c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Antigens und des Antikörpers durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

5 Der Nachweis des Antigens findet bevorzugt unter Verwendung eines Sandwichtests und der Nachweis des Antikörpers bevorzugt unter Verwendung eines Brückenkonzepts, eines Rücktitrationskonzepts oder eines indirekten Testformats statt.

10 Bevorzugt wird der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung einer Rücktitration durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei, daß bei gleichzeitiger Verwendung eines Sandwichtests zum Nachweis des Antigens keine gegenseitige Beeinflussung von Nachweismolekülen stattfinden kann, da in diesem Fall für den Nachweis des Antigens und den Nachweis des

15 Antikörpers das gleiche Nachweisreagenz verwendet werden kann. Für einen Sandwichtest zum Nachweis eines Antigens, z.B. HIV-p24, wird beispielsweise ein gegen dieses Antigen gerichteter Antikörper auf einer Testfläche immobilisiert. Als zum Nachweis dienender freier Rezeptor kann dann ein zweiter gegen das Antigen gerichteter, direkt oder indirekt

20 markierter Antikörper, z.B. ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper, verwendet werden. Zum Nachweis des entsprechenden, gegen das Antigen gerichteten Antikörpers, z.B. eines Anti-p24-Antikörpers, unter Verwendung einer Rücktitration wird ein mit dem Antikörper bindefähiges Antigen, z.B. p24, oder ein Fragment davon, auf einer weiteren Testfläche immobilisiert.

25 Als Nachweisreagenz dient ebenfalls der zweite gegen das Antigen gerichtete markierte Antikörper, z.B. ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper, welcher mit dem Analyten, das ist beispielsweise der in der Probe vorhandene natürliche Anti-p24-Antikörper um die Bindung an das immobilisierte Antigen kompetiert. So kann für den bevorzugten

30 gleichzeitigen Nachweis eines p24-Antigens und des dagegen gerichteten Anti-p24-Antikörpers jeweils das gleiche Nachweisreagenz, beispielsweise ein digoxigenylierter Anti-p24-Antikörper verwendet werden.

M 22.06.99

- 15 -

Wenn der Nachweis des Antigens durch einen Sandwichtest und der parallele Nachweis des Antikörpers durch einen Brückentest oder einen indirekten Test erfolgt, müssen spezielle Testreagenzien verwendet werden, um eine wechselseitige Beeinflussung der Nachweisreagenzien auszuschließen. Bei einem indirekten Test zum Nachweis eines Antikörpers, z.B. eines Anti-p24-Antikörpers, wird beispielsweise ein Antigen, für das der nachzuweisende Antikörper spezifisch ist, z.B. p24, auf einer Testfläche immobilisiert. Zum Nachweis des Antikörpers wird dann ein markierter Antikörper, der zwar den nachzuweisenden Antikörper, aber nicht das immobilisierte Antigen erkennt, beispielsweise ein digoxigenylierter Anti-Human IgG-Antikörper verwendet. Bei der parallelen Antigenbestimmung im Sandwich-Format können auf der Nachweiseite ein oder mehrere Antikörper, bevorzugt monoklonale Antikörper, eingesetzt werden, deren Epitopbindestellen bekannt sind. Gleichzeitig können bei der Antikörper-Bestimmung im indirekten Testformat oder im Brückenformat keine nativen oder rekombinanten Antigene verwendet werden, die mit dem Nachweisantikörper bindefähigen Epitope enthalten, da sonst eine unerwünschte Reaktion stattfindet. Statt dessen müssen vorbestimmte, rekombinante Antigene oder Peptidantigene ohne diese Epitopbindestellen verwendet werden, an die der oder die eingesetzten Nachweisantikörper nicht bindefähig sind.

Durch die erfindungsgemäße Multiepitopanalyse mit Arraysystemen ist es möglich, eine Kombination von Antigen- und Antikörper-Nachweisen für ein bestimmtes Antigen und einen gegen dieses bestimmte Antigen gerichteten Antikörper durchzuführen. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren bestehende diagnostische Lücke zwischen dem ersten Auftreten eines Antigens und dem zeitlich versetzten Auftreten von Antikörpern zu schließen und eine Probe sehr früh als positiv bzw. negativ einzustufen. Üblicherweise werden Proben von Patienten genommen, wobei die Sensitivität eines Tests durch eine möglichst frühe Erkennung von positiven Proben bestimmt wird. Bei einer Infektion treten

die verschiedenen Marker, die diese Infektionen anzeigen, wie beispielsweise Antigene oder gegen diese Antigene gerichteten Antikörper mit unterschiedlichem zeitlichen Verlauf auf.

5 Das erfindungsgemäße Multiepitopverfahren mit einer Arrayanordnung ermöglicht zudem durch die räumlich getrennte Anordnung der einzelnen Testflächen eine spezifische Unterscheidung zwischen Antigen- und Antikörpertests. Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist insbesondere bei HIV-Tests erkennbar. Ein bevorzugtes Beispiel für das

10 erfindungsgemäße Verfahren ist der gleichzeitige Nachweis eines HIV-Antigens und dagegen gerichteten Antikörper z.B. des p24-Antigens und des entsprechenden Anti-p24-Antikörpers. Bei einer HIV-Infektion treten zuerst p24-Antigene auf. Diese können mit einem Antigentest, nicht jedoch mit einem Antikörpertest nachgewiesen werden. Nach dem Auftreten der

15 Antigene werden im Körper Antikörper gegen diese Antigene gebildet. Bei den herkömmlichen Kombitests ist es jedoch nicht möglich, den p24-Antigentest mit einem Anti-p24-Antikörpertest zu kombinieren, vielmehr findet eine Kombination des p24-Antigentests mit einem Anti-gp41-Antikörpertest statt. Da die Bildung von Anti-gp41-Antikörpern zeitlich

20 jedoch nach der Bildung von Anti-p24-Antikörpern erfolgen kann, können im Zeitraum bis zur Bildung der Anti-gp41-Antikörper bei herkömmlichen Verfahren falsch negative Ergebnisse erhalten werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist demgegenüber sicherer, da auch Anti-p24-Antikörper, bestimmt werden können.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt wird die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche, in der das Antigen nachgewiesen werden soll, aus immobilisierten Antikörpern gebildet, die spezifisch für Epitope des nachzuweisenden Antigens sind. Aufgrund der bevorzugt verwendeten

30 Arraystruktur ist es möglich, mehrere Antikörper, die für unterschiedliche Subtypen des nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen aufzubringen. Die Antikörper werden entsprechend dem zu

analysierenden Antigen ausgewählt. Beim Screening auf eine virale Infektion werden bevorzugt Anti-HIV-I-Antikörper, Anti-HIV-II-Antikörper, Anti-HBV-Antikörper oder/und Anti-HCV-Antikörper getestet. Analog umfaßt die bindefähige Beschichtung der weiteren Testflächen, auf der ein Antikörper nachgewiesen werden soll, bevorzugt Antigene, die spezifisch für den nachzuweisenden Antikörper sind. Auch hier können grundsätzlich beliebige, auf den jeweiligen Test abgestimmte Antigene verwendet werden, bevorzugt werden Antigene oder Epitope davon aus HIV-I, HIV-II, HBV oder/und HCV verwendet.

Durch die Verwendung einer nichtporösen Festphase können besonders gute Ergebnisse mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden. Eine nichtporöse Festphase bietet insbesondere Vorteile beim Aufbringen der Testreagenzien, wobei ein definiertes Aufbringen ohne Ineinanderfließen der einzelnen Testflächen möglich ist. Weiterhin ist es bei Verwendung von nichtporösen Testphasen möglich, das Testformat zu miniaturisieren. Bei miniaturisierten Testformaten ist es möglich, eine Vielzahl von Testflächen auf eine einzige nichtporöse Festphase aufzubringen.

Der Nachweis der Bindung eines Antigens oder Antikörpers an die Testflächen wird bevorzugt unter Verwendung von markierten Antikörpern durchgeführt, die gegen den Analyten gerichtet sind. Beim Nachweis des Antigens im Sandwichformat wird dabei ein gegen dieses Antigen gerichteter markierter Antikörper verwendet. Der gleiche markierte Antikörper dient auch zum Nachweis des Analyten-Antikörpers beim kompetitiven Format, z.B. einer Rücktitration. Durch räumlich getrennte Auswertung der einzelnen Testflächen ist es somit möglich, mit einem einzigen Nachweisreagenz sowohl Antigen als auch den für dieses Antigen spezifischen Antikörper nachzuweisen, ohne daß sich die beiden Nachweisverfahren gegenseitig beeinträchtigen würden. Geeignete Markierungssubstanzen zur Markierung von Antikörpern sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. fluoreszierende Gruppen, chemilumineszierende

Gruppen, radioaktive Markierungen, Enzymmarkierungen, farbige Markierungen und Solpartikel. Bevorzugt ist die Verwendung eines universellen Nachweisreagenzes, insbesondere von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln, welche z.B. mit den Nachweisrezeptoren bindefähig ist.

5

10

15

20

25

30

Besonders gute Ergebnisse werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten, wenn die spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen separat aufgebracht werden. Dadurch ist es möglich, die Bindekapazität der einzelnen Testflächen optimal auszunutzen und optimal bindefähige Beschichtungen herzustellen. Gegebenenfalls können die bindefähigen Reagenzien durch Verdünnermoleküle verdünnt werden, um die Bindefähigkeit der Beschichtung weiter zu verbessern. Geeignete Verdünnermoleküle sind Moleküle, die nicht mit dem zu bestimmenden Analyten binden und die auch keine unspezifische Wechselwirkung oder Bindung zu anderen Probenbestandteilen zeigen, was zu falschpositiven Ergebnissen führen könnte (vgl. WO92/10757, EP 0 664 452 A2). Besonders bevorzugt wird die Beschichtung in den einzelnen Testflächen jeweils aus einem einzigen spezifisch bindefähigen Molekültyp gebildet. Unterschiedliche, mit dem Analyten bindefähige Reagenzien werden dabei in verschiedene Testspots aufgebracht. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter zu erhöhen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Festphase zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens eine zweite Testfläche, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper bindefähigen Beschichtung aufweist, wobei die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen Typ eines bindefähigen Reagenz enthalten. Die Beschichtungen sind gleichmäßig auf die Testflächen aufgebracht, das

11.22.08.99

- 19 -

heißt, sie sind homogen. Neben dem bindefähigen Reagenz können die Testflächen inerte Verdünnermoleküle umfassen, die weder mit dem nachzuweisenden Analyten noch mit anderen Probenbestandteilen Wechselwirkungen eingehen können.

5

Während grundsätzlich beliebige Trägermaterialien verwendet werden können, sind die Testflächen der erfindungsgemäßen Festphase bevorzugt auf einen nichtporösen Träger aufgebracht. Durch die Verwendung von nichtporösen Oberflächen ist insbesondere eine Miniaturisierung des Testformates und die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl von Testflächen.

10

15

Die erfindungsgemäße Festphase eignet sich insbesondere zur Verwendung in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers. Auf diese Weise ist es möglich, die Sensitivität und Zuverlässigkeit von Immuntests weiter zu verbessern.

20

25

Die Erfindung umfasst auch einen Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers, welches die erfindungsgemäße Festphase sowie markierte Nachweisreagenzien zum Nachweis von an die Testflächen gebundenem Antigen und Antikörper umfasst. Geeignete Nachweisreagenzien sind beispielsweise markierte Antikörper, wobei die Markierung aus den oben genannten Gruppen ausgewählt sein kann.

30

Ein weiteres Problem bei den bisher verfügbaren Routentests besteht darin, daß alle für einen Test, beispielsweise einen HIV-Test, notwendigen Antigene und Antikörper gemischt werden und für das Nachweisverfahren eine für dieses Gemisch optimale Cut-Off-Grenze festgelegt wird. Durch die Verwendung einer gemeinsamen Cut-Off-Grenze für alle Parameter wird die Cut-Off-Grenze jedoch durch die unspezifische Bindung des schlechtesten

Einsatzstoffes bestimmt und begrenzt. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

- 5 (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
- 10 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen, wobei ein Signal oberhalb eines vorbestimmten Testflächen-spezifischen Grenzwertes als positiv und unterhalb eines vorbestimmten Testflächen-spezifischen Grenzwertes als negativ klassifiziert wird.

Durch die Verwendung von vorbestimmten Testflächen-spezifischen Grenzwerten für jede einzelne Testfläche ist es möglich, die Spezifität von Nachweisverfahren deutlich zu verbessern, während die Sensitivität unverändert hoch bleibt. Der Grenzwert oder Cut-Off-Wert wird mittels der Größen Signal der Probe, Hintergrund der Probe und Hintergrund einer Negativkontrolle bestimmt. Eine übliche Berechnung des Cut-Off-Wertes (COI) erfolgt beispielsweise nach der Formel:

$$\text{COI} = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{n \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$$

Ein üblicher Wert für n beträgt beispielsweise 2. Der Faktor n - und damit der Cut-Off-Wert - kann für bestimmte Testflächen heraufgesetzt werden, bei denen falschpositive Proben beobachtet werden, wobei n eine Zahl zwischen 2 und 100, bevorzugt zwischen 2 und 10 sein kann.

M 22.05.99

- 21 -

Bevorzugt werden die Grenzwerte jeweils individuell für eine Testfläche bestimmt. Dies bedeutet, daß für die unterschiedlichen Testflächen unterschiedliche Grenzwerte bzw. Cut-Off-Werte festgelegt werden, insbesondere werden die Grenzwerte für mindestens zwei Testflächen
5 unterschiedlich festgelegt. Bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens machen von den oben beschriebenen Merkmalen Gebrauch.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

10 Beispiele

1. Test auf Anti-HIV-Antikörper mit mehreren Antigen-spezifischen Testflächen mittels Microspot-Technologie

15 Microspot ist eine miniaturisierte ultrasensitive Technologie, die ideal zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Parametern in einem einzigen Meßvorgang geeignet ist. Im Fall der Bestimmung von Anti-HIV-Antikörpern werden verschiedene HIV-Nachweisantigene in sogenannten "Arrays" jeweils einzeln mittels einer Inkjet-Methode auf eine Testfläche (Spot) auf
20 einem Polystyrolträger aufgebracht. Bei der Testdurchführung werden 30 µl mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnte Probe auf den mit Testflächen versehenen Träger pipettiert und 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und Waschen mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 1, die eine Mischung aller
25 Digoxigenin-markierten HIV-Antigene enthält, zugegeben und wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz zugegeben. Als universelles Nachweisreagenz dienen 100 nm große, fluoreszierende Latexpartikel, die
30 kovalent mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichtet sind.

Dieses Nachweisreagenz wird wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und trockengesaugt. Die Testflächen werden dann mit einem He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz bei 670 nm Wellenlänge mit einer CCD-Kamera vermessen.

Die Festphase enthält spezifische Testflächen mit folgenden immobilisierten Antigenen:

- rekombinantes p24 Polypeptid
- rekombinante Reverse Transkriptase (RT)
- gp41-Peptid 1
- gp41-Peptid 2

Als Probenpuffer wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 7,6 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,5% Rinderserumalbumin (RSA), 0,1% Rinder-IgG, 0,01% Methylisothiazolon, 3% Pepton.

Als Reagenzlösung 1 wurde der oben beschriebene Probenpuffer verwendet, der folgende testspezifische Antigene enthält:

- Digoxigenin-markiertes, rekombinantes p24
- Digoxigenin-markierte, rekombinante Reverse Transkriptase
- Digoxigenin-markiertes gp41-Peptid 1
- Digoxigenin markiertes pg41-Peptid 2

Als Reagenzlösung 2 wurde ein 50 mM Tris-Puffer pH 8,0 mit folgenden Zusätzen verwendet: 0,05% Tween 20, 0,9% NaCl, 0,5% RSA, 0,1% Na-azid und 0,01% von fluoreszenzmarkierten, einem monoklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper beschichteten Latexpartikeln.

2. Vergleich eines Anti-HIV-Antikörper-Tests im Microspot-Format zu konventionellen Methoden

In diesem Versuch wurden sogenannte Serokonversionsproben vermessen. Diese Proben sind zeitlich aufeinanderfolgende Abnahmen verschiedener Personen, deren Serumbefund von HIV-negativ nach HIV-positiv konvertiert. Je sensitiver eine Testmethode ist, desto früher kann ein HIV-spezifisches Antikörper-Signal nachgewiesen werden. Die Proben wurden mit der erfindungsgemäßen Methode (Microspot) und vergleichend mit einer bekannten Methode (Enzymun® von Boehringer Mannheim) vermessen. Die dabei verwendeten, HIV-spezifischen Einsatzstoffe waren in beiden Testsystemen identisch, die sich daher vor allem nur durch die getrennte Einzelspot-Analyse unterscheiden. In der nachfolgenden Tabelle sind die Cut-off-Indices (Cut-off-Index = $\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}} / 2 \times \text{Signal}_{\text{Negativkontrolle}}$) der beiden Methoden aufgetragen und zusätzlich mit Westernblot-Daten verglichen:

Serokonversions-Panel der Fa. BBI	Tag der Abnahme	p24	RT	gp41-Peptid 1	gp41-Peptid 2	Western-Blot	Enzymun®
R 2. Abnahme	2	0.0	0.0	0.0	1.3	negativ	0.5
3. Abnahme	7	22.2	0.0	0.0	2.4	indifferent	15.4
4. Abnahme	13	17.4	2.6	4.4	36.4	positiv	36.0
AB 1. Abnahme	0	0.0	0.0	0.6	0.0	negativ	0.3
2. Abnahme	28	0.0	0.0	0.4	1.1	negativ	0.7
3. Abnahme	33	0.0	0.0	5.5	54.4	negativ	24.2
4. Abnahme	35	0.8	0.2	6.0	33.2	positiv	26.7
5. Abnahme	37	15.2	5.1	4.6	33.0	positiv	28.9
AD 5. Abnahme	21	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.3
6. Abnahme	25	0.2	0.0	1.6	3.7	positiv	0.9
7. Abnahme	28	14.1	0.3	11.1	65.5	positiv	24.5
AG 3. Abnahme	13	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.4
4. Abnahme	27	0.0	0.0	0.0	1.1	negativ	0.6
5. Abnahme	34	6.0	5.3	0.0	106.9	positiv	8.1
6. Abnahme	50	6.1	5.4	0.0	65.4	positiv	3.1
7. Abnahme	78	1.0	6.8	0.0	23.9	positiv	1.6
8. Abnahme	163	1.5	5.3	0.0	4.9	positiv	0.6
9. Abnahme	194	2.3	2.5	0.0	2.8	positiv	0.7
AI 1. Abnahme	0	0.0	0.0	1.2	0.1	indifferent	0.8
2. Abnahme	7	0.6	0.5	54.7	44.9	positiv	30.2
3. Abnahme	11	1.1	0.7	18.8	22.5	positiv	30.2

Dieser Vergleich zeigt, daß durch die Aufteilung in Einzelspots mit jeweils optimalen Antigenkonzentrationen die Sensitivität im Vergleich zu bekannten Tests deutlich verbessert werden konnte. Von den 5 Serokonversions-Panels werden 7 Abnahmen früher positiv erkannt. Dies entspricht je nach Panel einer früheren Detektion der HIV-Infektion von 3 bis 7 Tagen. Auch im Vergleich zum Westernblot wurde eine deutliche Steigerung der Sensitivität mit 6 früher erkannten Abnahmen erreicht.

3. Vergleich einer kombinierten Bestimmung von HIV p24-Antigen sowie Anti-gp41- und Anti-RT-Antikörpern im Microspotformat zu konventionellen Methoden

Zur Evaluierung der Sensitivität wurden wiederum sogenannte Serokonversionsproben vermessen. Die Bestimmung erfolgte mit der erfindungsgemäßen Methode (Microspot) und die dabei erhaltenen Daten wurden mit den derzeit besten verfügbaren Anti-HIV-Tests (siehe Datenblätter der Hersteller von Serokonversionspanels, z.B. Firma BBI) bzw. mit dem Enzymun®-Kombinationstest von Boehringer Mannheim (kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und Anti-HIV-Antikörpern) verglichen.

Für das Microspotttestformat wurden folgende (wie in Beispiel 1 hergestellte) Testflächen (Einzelspots) verwendet:

- monoklonaler Anti-p24-Antikörper A zur Bestimmung des p24-Antigens von HIV Subtyp B
- monoklonaler Anti-p24-Antikörper B zur Bestimmung des p24-Antigens von HIV Subtyp B und O
- gp41-Peptid 1 zur Bestimmung von Antikörpern gegen gp41
- gp41-Peptid 2 zur Bestimmung von Antikörpern gegen gp41
- rekombinante Reverse Transkriptase (RT) zur Bestimmung von Antikörpern gegen RT

Die im Mikrosport-Test verwendeten HIV-spezifischen Einsatzstoffe waren vergleichbar mit den im Enzymun®-Test verwendeten Einsatzstoffen, so daß sich der Microspot-Test von Enzymun®-Methode vor allem nur durch die getrennte Einzelspotanalyse unterscheidet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Cut-Off-Indices (Bestimmung siehe Beispiel 2) der beiden Methoden aufgelistet und zusätzlich mit den bisher bekannten sensitivsten Anti-HIV-Tests verglichen.

Serokonversions- Panel (Fa. BBI)	MAK <p24>A	MAK <p24>B	RT	gp41- Peptid 1	gp41- Peptid 2	sensitivster <HIV>-Test	Enzymun Kombi
Q 1. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	negativ	0.30
2. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.66
3. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	
4. Abnahme	nd	nd	nd	nd	nd	positiv	
W 6. Abnahme	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	negativ	0.30
7. Abnahme	0.5	1.1	0.0	0.0	0.1	negativ	0.32
8. Abnahme	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	negativ	0.41
9. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	positiv	
Z 2. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	0.31
3. Abnahme	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	negativ	0.61
4. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	
5. Abnahme	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	positiv	
AD 2. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	negativ	0.30
3. Abnahme	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	negativ	0.33
4. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	negativ	
5. Abnahme	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	positiv	
6. Abnahme	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	positiv	
AF 3. Abnahme	0.1	0.6	0.2	0.0	0.2	negativ	0.31
4. Abnahme	0.4	0.0	0.0	0.0	0.02	negativ	0.30
5. Abnahme	0.0	0.0	0.02	0.0	0.0	negativ	0.34
6. Abnahme	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	positiv	

Dieser Vergleich zeigt, daß die kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und HIV-Antikörpern durch das Microspot-Testformat im Vergleich zu konventionellen Methoden deutlich verbessert werden kann. So ist der kombinierte Microspot-Test um ein Vielfaches sensitiver als der Enzymun®-Kombitest, bei dem alle Antigene und Antikörper in gemischter Form vorliegen. Bei den geprüften fünf Serokonversionspanels wurden im Vergleich zum sensitivsten Antikörpertest neun Abnahmen, im Vergleich zum Enzymun®-Kombitest immer noch sechs Abnahmen früher positiv detektiert.

4. Kombinierte Bestimmung von p24-Antigen und Anti-p24-Antikörpern nach dem Rücktitrationsprinzip

Zur kombinierten Bestimmung des p24-Antigens und von Antikörpern gegen p24 im selben Array-System wurde ein p24-Antigen-Test im Sandwichformat und ein Anti-p24-Antikörper-Test im Rücktitrationsformat durchgeführt.

Es wurden Arrays mit folgenden p24-spezifischen Reagenzien jeweils auf Einzelspots (siehe Beispiel 1) hergestellt:

(a) Panel mit p24-Antigen und Anti-p24-Antikörper-Test:

(i) p24-Antigen-Test:

- | | |
|---------------|--|
| Testfläche 1: | monoklonaler Anti-p24-Antikörper A Fab'-Fragment, biotinyliert (100 µg/ml) |
| Testfläche 2: | monoklonaler Anti-p24-Antikörper B Fab'-Fragment, biotinyliert (100 µg/ml) |

(ii) Anti-p24-Test im Rücktitrationskonzept:

- | | |
|---------------|--|
| Testfläche 3: | biotinyliertes p24-Antigen (0,3 µg/ml) |
|---------------|--|

- (b) Vergleichspanel mit Anti-p24-Antikörpertest im Brückenkonzept:
- biotinyliertes p24-Antigen (14 $\mu\text{g/ml}$)

Bei der Testdurchführung wurden zu jedem Panel 30 μl mit Probenpuffer im
 5 Verhältnis 1:1 verdünnte Probe pipettiert und 45 min unter Schütteln bei
 37°C Inkubationstemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und
 Waschen mit Waschpuffer wurden 30 μl Reagenzlösung 1, die eine
 Mischung aller Digoxigenin-markierten HIV-Antigene und HIV-Antikörper
 enthält, zugegeben und 10 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert.
 10 Folgende p24-spezifische Reagenzien wurden eingesetzt:

- (a) Panel mit p24-Antigen- und Anti-p24-Antikörper-Test:
- monoklonaler Anti-p24-Antikörper D F(ab')₂-Fragment,
 digoxigenyliert (500 ng/ml)
 - 15 - monoklonaler Anti-p24-Antikörper E F(ab')₂ Fragment,
 digoxigenyliert (500 ng/ml)
- (b) Vergleichspanel mit Anti-p24-Antikörpertest im Brückenkonzept:
- digoxigenyliertes p24-Antigen (30 ng/ml)

20 Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen mit Waschpuffer
 wurden 30 μl Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz (siehe Beispiel 1)
 zugegeben. Dieses Nachweisreagenz wurde 5 min unter Schütteln bei 37°C
 inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

25 Das Testfeld wurde mit einem He-Ne-Laser der Wellenlänge 633 nm
 bestrahlt und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 670 nm mit einem
 konfokalen Laser-Scanner vermessen.

30 Mit beiden Panels wurden vergleichend 11 für HIV negative und 19 für HIV
 positive Proben vermessen: Die Cut-Off Indices (COI) für beide Testformate
 sind in der folgenden Tabelle angegeben.

5

10

15

20

25

30

Probennummer	COI <p24> Rücktitration*	-COI <p24> Brückenformat**
Negativkontrolle	2412 Cts	93 Cts
Positivkontrolle	1276 Cts	24651 Cts
Negativprobe 145	1.39	0.3
Negativprobe 196	1.54	0.2
Negativprobe 122	1.43	0.1
Negativprobe 160	1.41	0.2
Negativprobe 141	1.28	0.2
Negativprobe 168	1.58	0.2
Negativprobe 222	1.38	0.2
Negativprobe 280	1.42	0.2
Negativprobe 232	1.32	0.2
Negativprobe 201	1.54	0.3
Negativprobe 211	1.33	0.2
Positivprobe 154	0.31	534
Positivprobe 132	0.47	537
Positivprobe 130	0.42	547
Positivprobe 138	0.46	473
Positivprobe 163	0.47	591
Positivprobe 176	0.39	505
Positivprobe 204	0.39	531
Positivprobe 167	0.39	588
Positivprobe 221	0.79	351
Positivprobe 174	0.30	506
Positivprobe 285	0.43	506
Positivprobe 150	0.76	422
Positivprobe 179	0.58	596
Positivprobe 236	0.55	573
Positivprobe 337	0.60	491
Positivprobe 203	0.35	573
Positivprobe 147	0.72	610
Positivprobe 285	0.47	584
Positivprobe 289	0.30	496

* $COI = \frac{Signal_{Probe} - Signal_{Untergrund}}{0,7 \times Signal_{Negativkontrolle}}$; $COI > 1,0 = negativ$

** $COI = \frac{Signal_{Probe} - Signal_{Untergrund}}{2 \times Signal_{Negativkontrolle}}$; $COI > 1,0 = positiv$

11.22.08.99

- 29 -

Sowohl alle negativen als auch alle positiven Proben konnten mit dem Rücktitrationsprinzip richtig detektiert werden. Durch die wechselwirkungsfreie Kombination von p24-Antigen- und Anti-p24-Antikörper-Tests können Serokonversionsproben früher detektiert werden und die Sicherheit vor falsch negativen Detektionen zusätzlich erhöht werden.

5. Verbesserung der Testspezifität durch Testflächen-spezifische Cut-Off-Berechnung

In bisher verfügbaren Routinetests werden alle für die Bestimmung notwendigen Antigene und Antikörper vermischt und eine für dieses Gemisch optimale Cut-Off-Grenze festgelegt. Diese wird durch die unspezifische Bindung des "schlechtesten" Einsatzstoffes bestimmt. Durch die erfindungsgemäße Microspot-Technologie kann man hingegen eine Testflächen-spezifische Cut-Off-Berechnung, die für jeden Einsatzstoff spezifisch ist, durchführen.

Bei identischer Berechnung des Cut-Off-Werts ($COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{2 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$) der einzelnen Testflächen konnte mit dem HIV-Kombinationstest (Beispiel 3) in 1264 Proben folgende Spezifität erreicht werden:

- p24-Antigen: 100%
- Anti-HIV-Antikörper-Test: 99,52% (sechs falsch positive Bestimmungen)

Da die falsch positiven Bestimmungen ausschließlich in den beiden Testflächen für gp41 Peptid 2 und Reverse Transkriptase auftraten, wurden die Cut-Off-Grenzen für diese Testflächen auf folgende Grenzwerte heraufgesetzt:

11.22.05.99

- 30 -

gp41-Peptid 2: $COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{5 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$

RT: $COI = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Untergrund}_{\text{Probe}}}{3 \times \text{Untergrund}_{\text{Negativkontrolle}}}$

- 5 Auf diese Weise konnte die Spezifität des HIV-Tests von 99,52% auf 99,92% (nur noch eine einzige falsch positive Bestimmung) verbessert werden. Auch die Sensitivität des Tests blieb unbeeinflusst, da der Cut-Off-Index des sensitiven p24-Antigentests nicht verändert wurde. So kann bei unverändert hoher Sensitivität eine deutliche Verbesserung der Spezifität
- 10 erzielt werden.

11.22.05.99

- 31 -

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend
5 die Schritte:
 - (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger
und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt,
wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte
analytspezifische Rezeptoren enthalten,
 - 10 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens
einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine
signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden
Gruppe bindefähig ist, und
 - (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des
15 Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf
den Testflächen.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß der nachzuweisende Analyt eine homogene oder heterogene
Population darstellt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß der Analyt eine heterogene Antikörperpopulation, ein
Antigengemisch oder ein Gemisch von gegebenenfalls
unterschiedlichen Antigenen und Antikörpern darstellt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch separates, direktes spezifisches Aufbringen
der unterschiedlichen analytspezifischen Rezeptoren auf die räumlich
getrennten Testflächen hergestellt wird.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
bindefähigen Molekültyp gebildet wird.
7. Verfahren nach einem vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Festphase verwendet, die zusätzlich mindestens eine
Kontrollfläche umfaßt, die keinen analytspezifischen Rezeptor enthält.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zum Nachweis aus dem Analyten und damit bindefähigen
Reagenzien gebildeten Komplexen ein universelles Nachweisreagenz,
insbesondere markierte Latexpartikel verwendet werden.
9. Festphase zum Nachweis eines Analyten in einer Probe,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie einen nichtporösen Träger und mindestens zwei räumlich
getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils
unterschiedliche Reagenzien enthalten, die spezifisch den zu
bestimmenden Analyten binden.

11.22.05.99

- 33 -

10. Festphase nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen jeweils unterschiedliche Reagenzien enthalten,
die an verschiedene Epitope oder/und Subtypen des Analyten
oder/und an verschiedene Analyttypen binden.
11. Festphase nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.
12. Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.
13. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 12 in
einem Immunoassay.
14. Testkit zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend eine
Festphase nach einem der Ansprüche 9 bis 12 sowie markierte
Nachweisreagenzien.
15. Testkit nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß er als universelles Nachweisreagenz markierte Latexpartikel
enthält.
16. Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
Probe, umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der in einer ersten Testfläche
ein mit dem zu bestimmenden Antigen bindefähiger

immobilisierter Rezeptor und in einer räumlich davon getrennten zweiten Testfläche ein mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähiger immobilisierter Rezeptor aufgebracht ist,

- 5 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Antigens und des Antikörpers durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.
- 10

17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antigens unter Verwendung eines Sandwich-
Tests durchgeführt wird.

15

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines
Rücktitrationskonzepts durchgeführt wird.

20

19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines
Brückenkonzepts durchgeführt wird.

25

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Antikörpers unter Verwendung eines indirekten
Testformats durchgeführt wird.

30

11.22.06.99

- 35 -

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der ersten Testfläche aus
immobilisierten Antikörpern gebildet wird, die spezifisch für ein Epitop
des nachzuweisenden Antigens sind.
22. Verfahren nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß Antikörper, die für unterschiedliche Subtypen des
nachzuweisenden Antigens spezifisch sind, in separaten Testflächen
aufgebracht werden.
23. Verfahren nach Anspruch 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Antikörper ausgewählt wird aus viralen Antikörpern,
insbesondere Anti-HIV-I-Antikörpern, Anti-HIV-II-Antikörpern, Anti-
HBV-Antikörpern und Anti-HCV-Antikörpern.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die bindefähige Beschichtung der zweiten Testfläche aus
Antigenen gebildet wird, die spezifisch für den nachzuweisenden
Antikörper sind.
25. Verfahren nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antigene ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus
HIV-I, HIV-II, HBV und HCV.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem zu bestimmenden Antigen um HIV p24 und bei dem zu bestimmenden Antikörper um Anti-p24 handelt.
- 5 27. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine nichtporöse Festphase verwendet wird.
- 10 28. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung von markierten Antikörpern, die gegen die Analyten gerichtet sind, durchgeführt wird.
- 15 29. Verfahren nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung ausgewählt wird aus fluoreszierenden Gruppen, chemilumineszierenden Gruppen, radioaktiven Markierungen, Enzymmarkierungen, farbigen Markierungen und Solpartikeln.
- 20 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis unter Verwendung eines universellen Nachweisreagenz, insbesondere markierten Latexpartikeln, durchgeführt wird.
- 25 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase durch direktes, separates Aufbringen der spezifisch bindefähigen Beschichtungen auf die einzelnen Testflächen hergestellt wird.
- 30

11.22.08.99

- 37 -

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Beschichtung auf den Testflächen jeweils aus einem einzigen
bindefähigen Molekültyp gebildet wird.

5

33. Festphase, zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines
spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers in einer
Probe, umfassend mindestens eine erste Testfläche und mindestens
eine zweite Testfläche,

10

dadurch gekennzeichnet,

daß die erste Testfläche eine spezifisch mit einem Antigen
bindefähige Beschichtung aufweist und die zweite Testfläche eine
spezifisch mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper
bindefähige Beschichtung aufweist.

15

34. Festphase nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Beschichtungen homogen sind und jeweils nur einen einzigen
Typ eines bindefähigen Reagenz enthalten.

20

35. Festphase nach Anspruch 33 oder 34,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Testflächen auf einen nichtporösen Träger aufgebracht sind.

25

36. Festphase nach Anspruch 35,

dadurch gekennzeichnet,

daß der nichtporöse Träger aus Polystyrol gebildet ist.

30

37. Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 36,

dadurch gekennzeichnet,

daß die einzelnen Testflächen einen Durchmesser von 0,01 bis 1 mm
aufweisen.

38. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 37 in einem Immunoassay zum gleichzeitigen Nachweis eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers.
- 5 39. Testkit zur gleichzeitigen Bestimmung eines Antigens und eines spezifisch gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpers umfassend eine Festphase nach einem der Ansprüche 33 bis 37 sowie markierte Nachweisreagenzien.
- 10 40. Testkit nach Anspruch 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein universelles Nachweisreagenz umfaßt.
- 15 41. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
 - 20 (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und mindestens einem freien analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist, und
 - (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf den Testflächen, wobei ein Signal oberhalb eines vorbestimmten testflächenspezifischen Grenzwerts als positiv und unterhalb eines vorbestimmten testflächenspezifischen Grenzwerts als negativ klassifiziert wird.

11.22.05.99

- 39 -

42. Verfahren nach Anspruch 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Grenzwerte jeweils individuell für eine Testfläche bestimmt
werden.

5

43. Verfahren nach Anspruch 41 oder 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Grenzwerte für mindestens 2 Testflächen unterschiedlich
festgelegt werden.

10

M 22.08.98

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe
beschrieben, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Festphase, die einen nicht porösen Träger und mindestens zwei räumlich getrennte Testflächen umfaßt, wobei die Testflächen jeweils unterschiedliche, immobilisierte analytspezifische Rezeptoren enthalten,
- (b) Inkontaktbringen der Probe mit der Festphase und einem zweiten analytspezifischen Rezeptor, der eine signalgebende Gruppe trägt oder mit einer signalgebenden Gruppe bindefähig ist und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten durch Bestimmung der signalgebenden Gruppe auf der Festphase.

sh/ANM/17316PDE1 25.08.98 12:05